

文章编号:1009-038X(2004)02-0008-04

重组大肠杆菌生产人血管抑素的发酵条件

邵玲莉, 周楠迪, 吴奇凡, 金坚, 田亚平*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 对重组人血管抑素表达菌株 pQE32-AGN 的生长及产物表达规律进行了探索, 确定了最佳发酵条件. 培养温度为 37 °C, 初始 pH 7.0, OD₆₀₀ 为 0.8~1.0 时开始诱导, 诱导持续时间为 6 h, 诱导剂浓度为 0.1 mmol/L, 最终目的产物达到菌体总蛋白的 35%, rhAGN 的表达量达到 560 mg/L.

关键词: 人血管抑素; 重组大肠杆菌; 发酵; 表达

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Fermentation Conditions of Angiostatin by Recombinant *E. coli*

SHAO Ling-li, ZHOU Nan-di, WU Qi-fan, JIN Jian, TIAN Ya-ping

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, 214036)

Abstract: The fermentation conditions for production of recombinant human angiostatin (rhAGN) by *E. coli* M15 were carefully optimized. The optimal conditions were as follows: optimal temperatures was 37 °C; initial pH was 7.0; the induction was started when OD₆₀₀ reaching 0.8~1.0; IPTG concentration was 0.1 mmol/L, and the induction lasted for 6 h. The amount of the recombinant protein was 35% of the total cellular protein, and the concentration of rhAGN reached 560 mg/L.

Key words: human angiostatin; recombinant *E. coli*; fermentation; expression

肿瘤的发生和发展依赖于新生血管的不断形成, 因而抑制新血管的形成 (angiogenesis), 从而抑制肿瘤的生成已成为攻克肿瘤的一个重要靶点^[1]. 血管抑素 (Angiostatin, 简称 AGN) 是 O'Reilly 等于 1994 年首先发现的一种内源性血管生成抑制剂^[2], 它能特异性抑制内皮细胞的增殖与转移. 小鼠实验表明, 它可有效地抑制乳腺癌、前列腺癌、Lewis 肺癌、神经胶质瘤等多种实体瘤^[3,4]. 目前,

血管抑素在美国已进入二期临床试验. 天然血管抑素的来源十分有限, 因此利用基因工程技术发酵生产重组蛋白具有重要的研究和应用价值. 卢文菊等以重组大肠杆菌工程菌 DH5a(pBVA2) 为菌种, 采用温度诱导方式, 在 5 L 发酵罐中目的蛋白最终产量达 276 mg/L. 作者以 pQE32-AGN 重组菌为发酵菌种, 对其培养条件和发酵条件进行了优化, 使血管抑素产量提高到 560 mg/L.

收稿日期: 2003-04-01; 修回日期: 2003-05-26.

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2002071) 资助课题.

作者简介: 邵玲莉 (1975-), 女, 山东烟台人, 生物工程专业硕士研究生. * 责任作者.

万方数据

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

宿主菌为大肠杆菌 M15,表达质粒为携带人血管抑素的 pQE32,由法国 INSERM U353 实验室 HE Lu 教授馈赠,保存于 -70°C 的15%甘油中。

1.2 试剂

蛋白胨(tryptone)和酵母粉(yeast extract)均购自英国 OXOID 公司;IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside,异丙基硫代- β -D-半乳糖苷)购自美国 ACROS ORGANICS 公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺及考马斯亮蓝 R-250 购自 Fluka 公司;其余为国产分析纯试剂。

1.3 LB 培养基

蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,氯化钠 10 g/L,pH 7.0。

1.4 菌种的培养

参考文献[5]。

1.5 菌体质量浓度和干重

菌体质量浓度使用分光光度计测 600 nm 的光吸收值 OD_{600} ,样品稀释至 OD 值在 0.1~0.7。取不同 OD 值的发酵菌悬液经 5 000 r/min 离心 30 min,用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液清洗两次,离心,称菌体湿重。将湿菌体在 90°C 下烘干至恒定值,用微量分析天平称细胞干重,吸光度与细胞干重在一定范围内呈线性。一个单位的 OD_{600} 约为干菌 0.4929 g,1 g 湿菌相当于 0.1954 g 干菌。

1.6 rhAGN 重组蛋白表达量和菌体总蛋白的测定

用常规 SDS-PAGE 凝胶电泳检测[6],再由 FR-980 凝胶电泳分析仪测 rhAGN 占菌体总蛋白的质量分数。菌体总蛋白测定采用 Lowry 法[7]。

2 结果与分析

2.1 装液量的确定

作者使用 250 mL 的三角瓶。由图 1 可见,装液量对菌体生长的影响不太显著,当装液量为 15~40 mL 时,菌体质量浓度变化非常小,超过 50 mL 以后,菌体质量浓度明显降低,而目的蛋白的表达在 15~70 mL 内几乎没有变化,为研究方便起见,装液量取 20 mL。

2.2 接种量的确定

由图 2 可见,在接种量为 5% 时菌体质量浓度最高,目的蛋白的表达在 1%~7% 范围内变化不大,因此接种量选取 5%。由此确定,实验中使用 250 mL 的三角瓶,每瓶装入 20 mL 培养基,接入

种子液 1 mL。

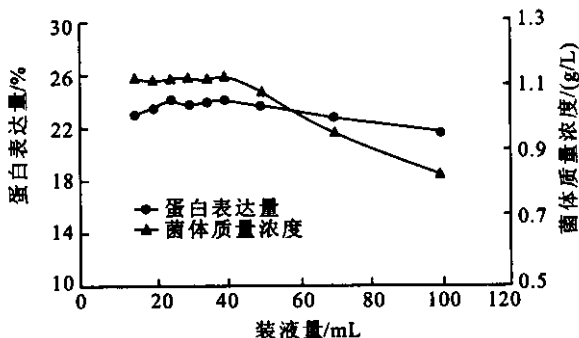


图1 装液量对菌体生长和目的蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of volume on cell growth and rhAGN production liquid

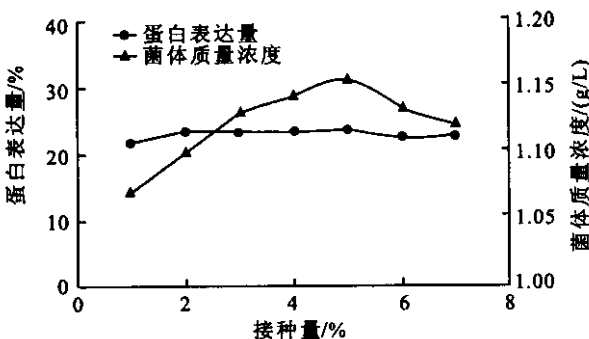


图2 接种量对菌体生长与目的蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of inoculum amount on cell growth and rhAGN production

2.3 诱导剂浓度的确定

诱导剂 IPTG 的加入,使阻遏蛋白不能与操纵基因 lac 结合,致使 rhAGN 大量表达。作者考察了不同用量的诱导剂对 rhAGN 蛋白表达的影响,见图 3。由图 3 可看出,诱导剂浓度为 0.0001,0.001 mmol/L 时,基本上没诱导效果,当浓度为 0.01 mmol/L 时,表达量达 9%,而诱导剂浓度为 0.1 mmol/L 时,表达量猛增至 27%,之后,再增加其浓度,外源蛋白的表达量不再提高。由于 IPTG 价格昂贵,在其他许多表达系统中,IPTG 最终浓度为 0.05~1.0 mmol/L,过低不起诱导作用,本工程菌以 0.1 mmol/L 为宜。

2.4 诱导剂添加时间对 rhAGN 表达的影响

工程菌的诱导一般在对数生长期进行。作者在每升培养液中加入 0.1 mmol IPTG,在发酵结束时间相同的条件下,比较了不同时期诱导对菌体生长和产物表达的影响。由图 4 可知,培养 3 h 后诱导效果最好(OD 值约为 0.8~1.0,即对数生长期的中前期),此时,菌体的质量浓度变化基本不大,而目的蛋白表达量最高,达到 34%。

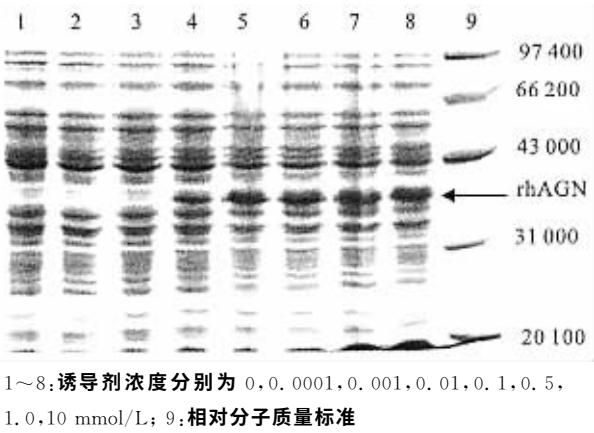


图 3 诱导剂浓度对 rhAGN 表达的影响

Fig. 3 Effect of different IPTG concentrations on rhAGN production

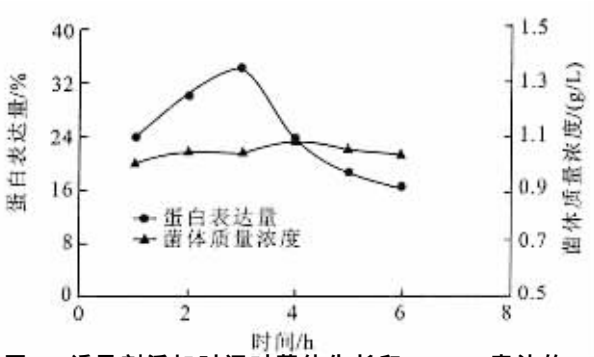


图 4 诱导剂添加时间对菌体生长和 rhAGN 表达的影响

Fig. 4 Effect of IPTG addition time on cell growth and rhAGN production

2.5 诱导持续时间对 rhAGN 表达的影响

考察诱导持续时间可以了解外源蛋白在菌体内表达和积累的情况,并据此判断高密度发酵结束的时间.因为重组菌在诱导后,大量的能量会消耗在外源蛋白的表达上,致使细菌的生长提前进入衰亡期,不及时收获会造成溶菌.发酵液培养 3 h 后加入 0.1 mmol/L 的 IPTG,诱导 2,4,6,8,10,12,20 h 后分别取样分析外源蛋白的表达情况,结果见图 5. 诱导 6 h 后,表达水平已稳定在 30%左右,继续培养不再提高,菌体密度也开始下降.因此,适宜的发酵结束时间是在诱导 6 h 后.

2.6 初始 pH 值对工程菌发酵的影响

由于外界 pH 值的变化会影响菌体内酶系的代谢反应,因而改变发酵过程中的 pH 值会影响产物的表达情况.取发酵培养基的初始 pH 值为 6.0,6.4,6.6,6.8,7.0,7.2,7.4,7.6,8.0,在其它条件不变的情况下,初始 pH 值对外源蛋白的表达影响甚小,表达量都在 34%左右,但当 pH 值大于 7.4

之后,菌体终浓度明显降低.因此,最适初始 pH 值为 LB 培养基的自然 pH 值 7.0.

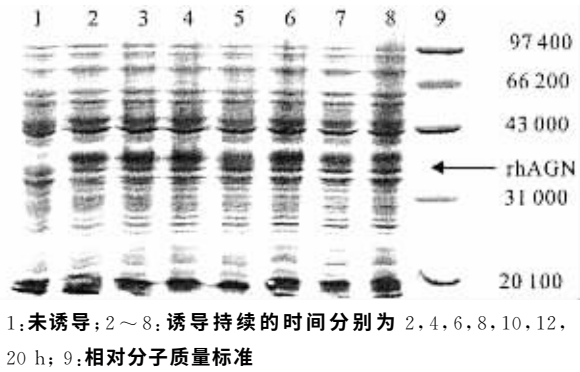


图 5 诱导持续时间对 rhAGN 表达的影响

Fig. 5 Effect of IPTG induction duration on rhAGN production

2.7 温度对工程菌发酵的影响

采用两阶段培养法研究大肠杆菌的最适生长温度和表达温度,分别取 30,34,37,42 ℃,接种 3 h 后,加 0.1 mmol/L IPTG 诱导 6 h,目的蛋白表达情况见图 6. 可以看出,温度对目的蛋白表达的影响不大,表达量都在 35%左右,但当表达温度为 30 ℃时,菌体生长的情况明显优于 42 ℃.考虑到诱导前培养温度为 37 ℃,诱导后 37 ℃与 30 ℃时菌体质量浓度差别不大,因此菌体的生长温度以 37 ℃为宜.此时,菌体质量浓度达 1.20 g/L, rhAGN 产量为 560 mg/L.

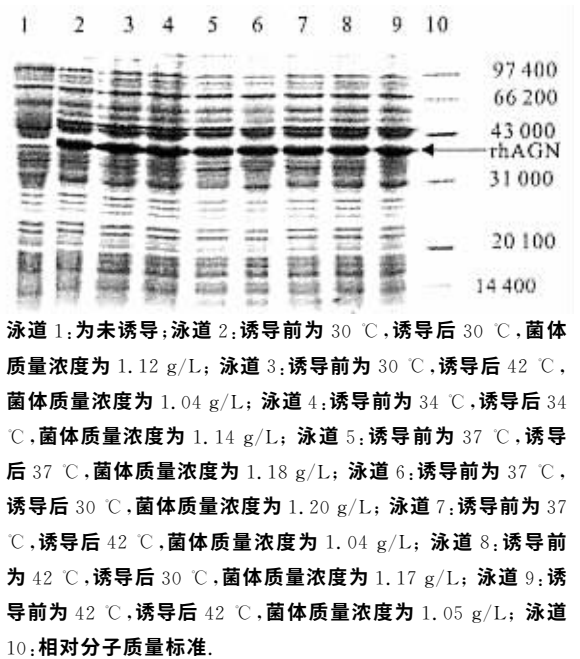


图 6 温度对 rhAGN 表达的影响

Fig. 6 Effect of temperature on rhAGN production

3 讨 论

利用重组菌的高密度发酵来生产基因工程产品具有极大的应用价值,然而进行大肠杆菌的高密度发酵必须克服许多困难,其中包括基因、载体、宿主三者的相互关系及培养条件.作者所用的工程菌的表达载体为 pQE32,它具有稳定性好、拷贝数高的特点,在 IPTG 诱导下,可实现 rhAGN 的高效表达,并且,克隆位点上游带有 6 个组氨酸的编码序列,表达产物末端带有 6 个组氨酸的融合蛋白(相对分子质量为 38 000),借助于亲和层析可使后续分离和提纯大为简化.

LB 培养基营养成分丰富,有利于菌体的生长.在条件优化中,培养温度和 pH 值对目的蛋白表达的影响不大,但培养温度对菌体的生长影响明显,诱导后高温培养不利于菌体的生长.

要实现外源基因的高表达而又不过多地影响宿主菌的生存,还需优化诱导剂添加时间、诱导持续时间、诱导剂浓度等参数.从所用菌株的诱导剂

添加时间与外源蛋白表达量的关系可以看出,当菌体培养至对数生长期的中前期时开始诱导,血管抑素表达量最高,过对数生长期后再诱导,表达量明显下降,说明菌体的生长状态对外源基因的表达是非常重要的.菌体浓度过高,菌体内各种酶的合成能力下降,蛋白质合成速度降低,同时由于发酵过程中代谢副产物的积累,造成部分细胞衰老死亡,甚至会出现细胞自溶现象,可能还会破坏已合成的目的蛋白.诱导剂浓度对目的蛋白表达也有显著影响,浓度过高,对菌体的生长产生抑制作用;若浓度过低,则启动子不能完全开放,目的蛋白产率较低.通过以上优化措施,大肠杆菌的菌体质量浓度达 1.20 g/L,目的产物占菌体总蛋白的 35%,产量达 560 mg/L.

另外,由于菌体的高密度生长,大量消耗培养液的营养成分,导致中后期营养不足,因此,在高密度发酵的中后期补加碳源和氮源是十分必要的.并且,由于大肠杆菌表达系统得到的目的蛋白是包涵体,要获得有活性的血管抑素必须对其进行变性及复性,这些都有待于进一步的研究与探讨.

参考文献:

- [1] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1989, 82:4—6.
- [2] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Angiostatin: an novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [J]. *Cell*, 1994, 79(1):315—328.
- [3] Kim Lee Sim B, O'Reilly MS, Liang H, *et al.* A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(2): 1329—1334.
- [4] O'Reilly MS, Holmgren L, Chen. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice [J]. *Nat Med*, 1996, 2 (6):689—692.
- [5] Lee SY. High cell-density culture *Escherichia coli* [J]. *Trends Biotechnol*, 1995, 14(3):98—105.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 908—910.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 47—50.

(责任编辑:李春丽)